ORIGINAL	TVAID III O	JEGROS DE MACHINA
INSTRUCCIONES:	1.— LLENE SOLAMENTE LOS RECLIADOS DE TOUCE EN	2.— SE ENTIENDE POR PRIORIDAD ADILETA DE LOTTE.

22 FECHA DE SOLICITUD	REF. 98.568	
CIA MES ANO		11 NUMERO CEL PRIVILEGIO
DIA MES AÑO 12 TIPO DE SOLICITUD	REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO, PROPÆDAD INDUSTRIAL	1 3 6 3 9 5
X PATENTE DE INVENCION PAFENTE PRECAUCIONAL MODELO DE UTILIDAD DISERO NOUSTRUL	MIDSEASE TIPO X AUTRITE DE SINERCION AUTRITE PRECAUCIONAL MODELO DE UTILIDAD	DOCLMENTOS ACOMANDOS YETT
TRANSPERDICA CAMBIO DE HOMBRE LICENICA	DISEAD SIGUSTRIA. X ONTRASTE	X PLEGO DE REVERCICACIONES DIBLIOS X PODER CESION COPIA PRIORIDAD PROTUDIPO TRACLICIA AL ESPACO, AL SERVICIA AL ESPACO, AL ESPAC
πτιο ο матеки σε ια souctivo "Composición para mejorar la ma	32) ress: 07-09-94	
71 SOLUTION		
71) SOLICIANTEIS: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERI GIST_BROCADES B.V. Vateringseweg 1, PO-Box 1, 2600	MA Delft SHOLANDA	ELFONO TO THE PARTY OF THE PART
OUPPE, Jerome. Francés.	MATERIO, NOMBRES - MACCINALIDADI	
REPRESENTANTE (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATER LETELIER, ARGENT & KRAHN	José Luis y/o EGANA, Juan	
······································		
	'O Piso 11°Santiago. 69680	18
		18
	O Piso 11°Santiago. 69680	
Moneda 97 ARODECIARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS	O Piso 11° Santiago. 69680 SERECUADROS DE TONO ROSADO. SON VERDA- SOBRE PROPEDAD NOUSTRIAL Y QUE EL PRE-	RECEPCION



REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:			
, X INVENCION	LO DE UTILIDAD		
PRECAUCIONAL MEJOI	RA		
REVALIDA			
(43) Fecha de Publicación07.08.1996	(51) Int. Cl. *:		
(21) Número de Solicitud: 7363-95			
(22) Fecha de Solicitud 07.09.1995	·		
(30) Número de Prioridad: (país. n° y fecha) EP 94202573.5 07.09.1994	(72) Nombre Inventor(es): (incluir dirección)		
	SOUPPE, Jerome.		
(71) Nombre Solicitante: (Incluir dirección y tel.)			
GIST - BROCADES B.V	-		
	(74) Representante: (incluir dirección y teléfono)		
Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft. HOLANDA	SARGENT & KRAHN Av. Andrés Bello 2711, Piso 19 Las Condes, Santiago 368-3500		

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

" Método de preparación de una masa, que incluye incorporar en la masa enzimas tales como hemicelulasas y sulfhidriloxidasa, en ausencia de glucosa oxidasa, composición enzimática constituída por endoxlanasa y/o arabinofuranosidasa y sulfhidrii oxidasa en ausencia de glucosa oxidasa, útil para preparar productos homeados."

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Un método para preparar una masa para un producto horneado, que incluye incorporar en la masa una cantidad eficaz de hemicelulasa y una cantidad eficaz de sulfhidril oxidasa donde el método comprende preparar la masa en ausencia de glucosa oxidasa.

Se presenta una composición de enzimas que comprende una hemicelulasa y una sulfhidril oxidasa en ausencia de glucosa oxidasa. La hemicelulasa puede ser una endoxilanasa y/o una arabinofuranosidasa. Se describe el uso de una composición como ésta para preparar masas de pan para productos homeados. composición se incorpora en la masa para aumentar la extensibilidad de la masa y el volumen del producto horneado.

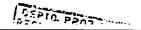


MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a la preparación de las masas para productos horneados, especialmente masas para pan. En particular, se refiere al uso de enzimas, por ejemplo en la forma de una composición mejoradora del pan, para mejorar las propiedades de estas masas.

Los agentes mejoradores del pan convencionales mezclas complejas que contienen diversos ingredientes funcionales, tales como agentes oxidantes y reductores (por ejemplo ácido ascórbico, cisteína), enzimas (por ejemplo alfa-amilasa, hemicelulasa), emulsionantes (por DATA-ésteres, monoglicéridos, SSL), materiales grasos (por ejemplo grasa, lecitina) y vehículos o materiales de relleno (almidón, azúcares, etc.). Muchos de los agentes mejoradores del pan comúnmente usados contienen oxidantes químicos tales como ácido ascórbico y bromato, que se usan para aumentar la 💄 resistencia de la masa. Desde el punto de vista del consumidor, es conveniente minimizar el uso de estos oxidantes, que se consideran como aditivos químicos. La resistencia de los consumidores a los aditivos químicos va en aumento y, por lo tanto, hay necesidad de reemplazar los oxidantes convencionales para masas por aditivos amigables con consumidor. Sin embargo, la calidad del pan baja considerablemente cuando se omiten los oxidantes. En realidad, es difícil lograr una masa adecuada para un producto horneado sin usar oxidantes.

La sulfhidril oxidasa ha sido investigada anteriormente como un sustituto de los oxidantes



convencionales no-enzimáticos en masas para pan. Sin embargo, se ha informado que la sulfhidril oxidasa bovina, como un aditivo enzimático único en estas masas, no tiene efectos beneficiosos significativos sobre las propiedades de la masa (Kaufmann y Fennema, Cereal Chemistry (1987) 64 (3), 172-176). Se ha informado anteriormente que la sulfhidril oxidasa microbiana es útil como un aditivo para la masa de pan, pero sólo en combinación con glucosa oxidasa (ver patente europea EP-A 0321811), o en combinación con glucosa oxidasa y actividad enzimática para descomponer hemicelulosa y/o celulosa (ver patente europea EP-A 0338452).

Hemos descubierto ahora sorprendentemente que adición de sulfhidril oxidasa, por ejemplo una sulfhidril oxidasa microbiana, a una masa para pan, puede tener un efecto beneficioso sobre las propiedades de la masa, en combinación con la adición de una o más hemicelulasas, incluso en ausencia de glucosa oxidasa. De manera importante, esta combinación de enzimas puede usarse en masas para pan con preferencia sobre oxidantes no-enzimáticos, tales como ácido ascórbico bromato. Incluyendo esta mezcla de enzimas en una masa para pan, es posible aumentar el volumen del pan manteniendo o incluso aumentando la extensibilidad de la masa. Por el contrario, es bien sabido que el uso de ácido ascórbico para aumentar el volumen del pan tendrá un efecto negativo sobre la extensibilidad de la masa. Esto 89 particularmente desfavorable en la preparación de productos horneados tales como pan francés alargado (French sticks), baguettes, pizza y croissants, Dara los cuales deseable 89 una alta extensibilidad de la masa.

Las hemicelulosas en los productos cereales consisten principalmente en beta-glucanos y pentosanos. hace mucho tiempo se ha reconocido que sería deseable una hidrólisis moderada de los pentosanos en las masas para pan (Enzymolysis of pentosans of wheat flour [Enzimolisis de pentosanos de harina de trigo], K. Kulp, Cereal Chem. (1968) 45, 339-350). Las hemicelulasas de Aspergillus niger y Aspergillus awamori son extensamente usadas en la industria panadera. Los inventores de la presente invención han encontrado que, entre las hemicelulasas, dos tipos son particularmente útiles para usar en masas para pan, combinación con la sulfhidril oxidasa: las endoxilanasas y las arabinofuranosidasas. Dos isoenzimas arabinofuranosidasas han sido identificadas: arabinofuranosidasa A (Ara A) y arabinofuranosidasa B (Ara B). Para el propósito de la presente invención, 80 prefiere una preparación de arabinofuranosidasa que comprende, COMO el componente enzimático, al menos predominantemente Ara B. Ara A y Ara B están descritas en "Mode of action of (1¾)beta-D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase (AXH) and alpha-L-arabinofuranosidase on alkali extractable wheat flour arabinoxylans" [Modo de acción de (1>4)beta-D-arabinoxilano arabinofuranohidrolasa (AXH) and alfa-L-arabinofuranosidasa sobre arabinoxilanos de harina de trigo extraíbles con álcali], Carbohydrate Research (1993), 24, 345-353, F.J.M. Kormelink; H. Gruppen; Voragen.

Para el propósito de la preparación de masas de acuerdo con la presente invención, la sulfhidril oxidasa puede ser derivada de <u>Aspergillus niger</u>, como se describe en

The Court of Hill \$ 140.

"Aspergillus niger sulfhydryl oxidase", R.S. de la Motte, F.W. Wagner, Biochemistry 26 (1987) 7363-7371.

En un aspecto, la presente invención provee por lo tanto un método para preparar una masa para un producto horneado, que incluye incorporar en la masa una cantidad eficaz de endoxilanasa y una cantidad eficaz de sulfhidril oxidasa en ausencia de glucosa oxidasa, con el fin de aumentar el volumen del producto horneado y producir una extensibilidad de la masa de al menos el 98% de la extensibilidad de la misma masa sin aditivos mejoradores.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, una cantidad eficaz de una preparación de arabinofuranosidasa, de mayor preferencia una preparación de arabinofuranosidasa en que Ara B es la isoenzima mayoritaria del componente enzimático, y una cantidad eficaz de sulfhidril oxidasa, pueden ser incorporadas en la masa con el fin de mejorar tanto el volumen del pan como la extensibilidad de la masa.

La presente invención puede aplicarse a una variedad de procesos de preparación de masas incluyendo fermentación directa, procesos de masas retardadas, procesos de masas fermentadas y procesos de masas congeladas. Puede aplicarse con harinas de cereales variados, tales como trigo o centeno, para fabricar toda clase de productos de harina fermentados con levadura tal como pan, y también productos endulzados tales como queques.

Sin embargo, como se indicó anteriormente, la metodología de la presente invención es particularmente favorable para su aplicación en la preparación de productos horneados en los cuales la extensibilidad de la masa es un factor crítico para la calidad del producto. Por ejemplo, el

uso de enzimas de acuerdo con la presente invención es especialmente favorable para la preparación de masas para pan francés adecuadas para la producción de pan francés alargado o baguettes.

En un proceso para preparar masas de la presente invención, las enzimas requeridas pueden agregarse separadamente o en la forma de una composición de enzimas mezcladas. Así, en otro aspecto, la presente invención provee una composición de enzimas para ser usada en un método para preparar masas de la invención, en la cual el componente enzimático comprende endoxilanasa y sulfhidril oxidasa en ausencia de una glucosa oxidasa, de preferencia junto con una o más arabinofuranosidasas. De mayor preferencia, composición de enzimas incluirá endoxilanasa, sulfhidril oxidasa y arabinofuranosidasa al menos predominantemente de la forma isoenzima B.

En otra modalidad, la presente invención provee una composición de enzimas en que el componente enzimático comprende endoxilanasa, sulfhidril oxidasa y arabinofuranosidasa, de preferencia al menos en su mayor parte Ara B.

Una composición de enzimas de la presente invención puede estar en la forma de una composición mejoradora del pan que contiene uno o más ingredientes secos de la masa adicionales, por ejemplo uno o más de entre sal, azúcar, lecitina, gluten, harina de soya, malta y otras enzimas conocidas para ser usadas como ingredientes de productos horneados, tales como beta-glucosidasa, beta-glucanasa, beta-xilosidasa, amiloglucosidasa, amilasa, proteasas, peroxidasa y catalasa. Esta composición mejoradora del pan

puede incluir el total o una alta proporción de la harina del producto horneado.

Las cantidades de endoxilanasa, sulfhidril oxidasa y arabinofuranosidasa requeridas para un proceso de preparación de masa de la presente invención dependerán de la harina empleada y del tipo de proceso, y pueden determinarse fácilmente mediante pruebas de horneado. A modo de guía, sin embargo, la cantidad de endoxilanasa puede estar en el intervalo de 1-1000 unidades por kg de harina, por ejemplo 5-200 unidades por kg de harina, y la cantidad de sulfhidril oxidasa puede estar en el intervalo de 5-1000 unidades por kg de harina, por ejemplo 30-250 unidades por kg de harina. Cuando se desea proporcionar adicionalmente actividad de arabinofuranosidasa a la masa, ésta puede estar presente, por ejemplo, en una cantidad en el intervalo de 1-1000 unidades por kg de harina, de preferencia en el intervalo de 5-200 unidades por kg de harina. Como se indicó anteriormente, esta actividad puede ser proporcionada deseablemente usando una preparación de arabinofuranosidasa en la cual Ara B es la isoenzima mayoritaria del componente enzimático.

Para preparar una masa para pan francés adecuada para pan francés alargado o baguettes, se ha encontrado conveniente por ejemplo incorporar alrededor de 50 unidades de sulfhidril oxidasa por kg de harina, en combinación con alrededor de 70 unidades de endoxilanasa por kg de harina. Para obtener una extensibilidad mejorada de la masa además de un volumen aumentado del pan, esta combinación de enzimas puede ser suplementada adecuadamente con alrededor de 70 unidades de arabinofuranosidasa, principalmente Ara B (ver Ejemplo 2).

Las unidades de endoxilanasa, sulfhidril oxidasa y arabinofuranosidasa dadas aquí deben entenderse como unidades definidas con referencia a los siguientes ensayos.

La actividad de endoxilanasa (Lyx) se mide por la hidrólisis de xilano de escandas de avena suspendido (35 g/l) en tampón de glicina 1M de pH 2,75. La viscosidad de la solución se determina usando un viscosímetro capilar (del tipo Ubbelhode) a 47°C. El tiempo (t) necesario para que el menisco superior del líquido caiga entre dos puntos de referencia se mide dentro del tiempo (T). La pendiente de la curva T versus 1/t da una constante cinética aparente. 1 unidad Lyx es la cantidad necesaria para alcanzar un valor de l min 1 para esa constante cinética.

La actividad de arabinofuranosidasa (Arf) se mide por la hidrólisis de p-nitrofenil-arabinofuranosido. Una unidad Arf es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de la prueba descrita en "Purification and some properties of an arabinofuranosidase from Aspergillus niger, action on grape monoterpenyl arabinosylglycosides" [Purificación y algunas propiedades de una arabinofuranosidasa de Aspergillus niger, acción sobre monoterpenil arabinosil glicósidos de uva], Z. Gunata, J.M. Brillouet, S. Voirin, R. Baumes, R. Cordonnier, J. Agric. Food Chem. 38 (1989) 772.

La sulfhidril oxidasa (Sox) convierte los compuestos tioles en sus correspondientes disulfuros de acuerdo con la ecuación :

2 RSH + O_2 -> RSSR + H_2O_2

La actividad de Sox se determina midiendo la desaparición de glutatión en solución tampón en la presencia de oxígeno. Una unidad Sox es la cantidad de enzima necesaria para oxidar un μ mol de glutatión por minuto a 30°C y pH 7.

Leyenda de la figura

Resultados de la prueba de alveógrafo descrita en el Ejemplo 1. Ref.: no se agregaron enzimas ni ácido ascórbico. Lyx + Sox (calc.) es el cálculo del efecto de Lyx + Sox suponiendo que no hay sinergismo. Lyx + Sox (Exp.) es el resultado experimental de Lyx + Sox.

Ejemplo 1

Con el fin de determinar los efectos reológicos de las enzimas y el ácido ascórbico (AA) separadamente, se efectuó el experimento siguiente.

Se usó una harina virgen, libre de todo aditivo o ayudante del procesamiento. Se agregó ácido ascórbico o una composición de enzimas de acuerdo con la Tabla 1. Se hizo operar un alveógrafo de acuerdo con un procedimiento estándard AFNOR V-03-710. Las trazas del alveógrafo fueron tomadas de un alveógrafo Chopin: amasado a 24°C por 20 minutos.

Tabla 1

Prueba Nº	AA (ppm)	Unidades Lyx	Unidades Sox	
, 1	0	0	0	
2	0	70		
3	_	. •	0	
•	0	0	500	
4	. 0	70		
5	100	. •	500	
	100	0	0	

Tabla 2

Prueba Nº	P	L	W
			•
1	76	75	179
2	76	76	181
3	86	70	206
4	78	77	204
5	103	63	220
			

En la Tabla 2, se muestran las propiedades reológicas de las masas formadas. El valor P está relacionado con la tenacidad de la masa, L está relacionado con la elasticidad y W con la resistencia de la masa (AFNOR V-03-710). Un resultado deseable es un aumento de la

resistencia (W) en combinación con un aumento de la elasticidad (L) y una reducción de la tenacidad (P).

Está claro que el ácido ascórbico aumenta la resistencia de una masa. Sin embargo, al mismo tiempo produce una reducción no deseada de la elasticidad y un aumento de la tenacidad. Al igual que en el caso de los agentes oxidantes químicos, Sox también aumenta la resistencia y la tenacidad pero reduce la elasticidad. En la Figura, se muestra el efecto de Lyx, Sox y la combinación Lyx + Sox sobre los parámetros P, L y W. Del efecto de Lyx y Sox por sí solas, se puede calcular un efecto combinado (Lyx + Sox (Calc.)). El efecto se compara con el resultado experimental (Lyx + Sox (Exp.)). Esto indica_que una combinación de Sox y Lyx da como resultado un fuerte sinergismo favorable sobre la extensibilidad y la tenacidad, en tanto que la resistencia de la masa no disminuye significativamente.

Ejemplo 2

Se preparó una masa mezclando:

2 kg de harina virgen francesa, 45 g de cloruro de sodio, 70 g de levadura para hornear, enzimas y/o AA (ver Tabla 3 más abajo; las unidades son unidades por kg de harina) y 1,2 litros de agua enfriada a 4°C, amasando por 15 minutos y enseguida

- dejando una parte en un sistema de leudado para su fermentación; la altura de ese trozo de masa después de 3 horas de fermentación permitió evaluar la tolerancia de la masa;

- conformando mecánicamente la parte restante en baguettes y midiendo la longitud. Esto permitó evaluar la extensibilidad de la masa. Las baguettes se dejaron fermentar a 20°C por 1h 45 min y finalmente se hornearon por 20 minutos a 225°C. Se midieron los volúmenes de los panes horneados.

Tabla 3

Prueba N°	Unids.Lyx	Unids.Arf	Unids.Sox	AA(ppm)
1	0	0		
2	\sim	Ū	0	0
2	0	0 _	0	80
3	40	10		
		10	. 0	80
4	70	0	50	0 .
5	70	70(AraB)	5.0	
_		(ALEB)	50	0
6	70	70(AraA)	50	0
7	0	70 ()		•
	Ü	70(AraB)	50	0

Tabla 4

Prueba N°	Extensibilidad (cm)	Tolerancia de la masa (mm)	Volumen del pan
1	70	70	2940
2	65	69	3080
3	69	67	3227
4	69	69	3258
5	75	69	3265
, 6	69	67	3200
7	69	73	3280
****		·	

Como se ve en la Tabla 4, la adición de ácido ascórbico solo aumentó el volumen del pan. Sin embargo, también redujo la extensibilidad de la masa. Como se mencionó anteriormente, esta reducción de la extensibilidad de la masa es un aspecto negativo de la aplicación de ácido ascórbico.

También se analizó el ácido ascórbico en combinación con Lyx y Arf, una combinación de aditivos conocida para el uso en productos horneados (Prueba Nº 3). Ara B era la isoenzima mayoritaria en la preparación de Arf.

En la Prueba Nº 4, se investigó una combinación de enzimas que dio como resultado un volumen del pan incluso mayor que el observado con la combinación de ácido ascórbico con Lyx y Arf. La extensibilidad era la misma que para la combinación de ácido ascórbico con Lyx y Arf.

Sorprendentemente se encontró que la extensibilidad de la masa mejoraba aún más con la adición de Arf, sin ningún efecto negativo sobre la tolerancia de la masa ni el volumen del pan (Prueba N°5).

La comparación de los resultados obtenidos en las Pruebas N° 5 y 6 muestran que Ara B se desempeña mejor que Ara A, principalmente con respecto a la extensibilidad y el volumen del pan.

Sorprendentemente se vio que la tolerancia de la masa y el volumen del pan eran óptimos con la combinación de Sox y Arf en reemplazo del ácido ascórbico (Prueba Nº 7).

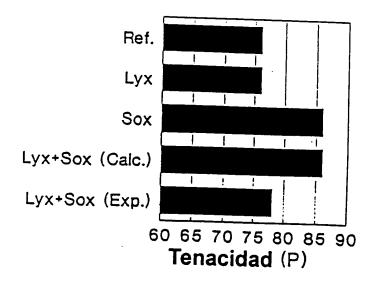
REIVINDICACIONES

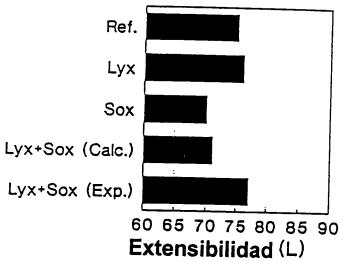
- 1. Un método para preparar una masa para un producto horneado, que incluye incorporar en la masa una cantidad eficaz de hemicelulasa y una cantidad eficaz de sulfhidril oxidasa, CARACTERIZADO porque la masa se prepara en ausencia de glucosa oxidasa.
- 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la hemicelulasa es una endoxilanasa.
- 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la hemicelulasa y sulfhidril oxidasa agregan con el fin de aumentar el volumen del producto horneado y producir una extensibilidad de la misma masa sin aditivos mejoradores.
- 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque la endoxilanasa se incluye en la masa a razón de 1-1000 unidades por kg de harina y la sulfhidril oxidasa se incluye en la masa a razón de 5-1000 unidades por kg de harina.
- 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la hemicelulasa es arabinofuranosidasa.

- 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque dicha preparación de arabinofuranosidasa se incluye en la masa en una relación de 1-1000 unidades de arabinofuranosidasa (Arf) por kg de harina.
- 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque el componente enzimático de dicha preparación es al menos predominantemente arabinofuranosidasa B.
- 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la masa es una masa de pan francés adecuada para la producción de una producto horneado seleccionado entre pan francés alargado (French sticks) y baguettes.
- 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la hemicelulasa comprende endoxilanasa y arabinofuranosidasa, siendo dicha arabinofuranosidasa predominantemente arabinofuranosidasa B.
- 10.Un método para fabricar un producto horneado, CARACTERIZADO porque comprende preparar una masa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y hornear la masa así preparada.
- 11.Una composición de enzimas para usar en el método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el componente

enzimático comprende hemicelulasa y sulfhidril oxidasa en ausencia de glucosa oxidasa.

- 12.Una composición de enzimas de acuerdo con la reivindicación ll, CARACTERIZADA porque incluye endoxilanasa y/o arabinofuranosidasa y sulfhiril oxidasa, en ausencia de glucosa oxidasa.
- 13.Una composición de enzimas para uso en una masa para un producto horneado CARACTERIZADA porque el componente enzimático comprende endoxiTanasa y/o arabinofuranosidasa y sulfhidril oxidasa en ausencia de glucosa oxidasa.
- 14. Una composición de enzimas de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque dicha arabinofuranosidas es predominantemente arabinofuranosidasa B, útil en un método para preparar una masa para un producto horneado.





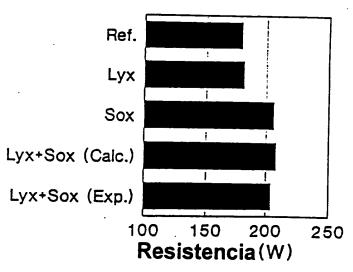


Figura.